

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/DE04/002761

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 103 59 830.8
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 16 March 2005 (16.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 59.830.8

Anmeldetag: 12. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber: co.don AG, 14513 Teltow/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzell-
transplantaten und dessen Anwendung als Trans-
plantationsmaterial

IPC: C 12 N 5/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Januar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Schäfer

PATENTANWÄLTE
GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG

European Patent and Trademark Attorneys
Patente Marken Design Lizenzen

GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.*
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.**
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.*

Schützenstraße 15-17
D-10117 Berlin

Tel.: 030/264 13 30

Fax: 030/264 18 38

e-mail: PatentAttorneys.GHZ@t-online.de

Internet: <http://www.berlin-patent.net>

Unser Zeich./our reference

P248203DE

Datum/date

Berlin, 12. Dezember 2003

co.don Aktiengesellschaft
Warthestraße 21
14513 Teltow

Erfinder: Dr. Meisel, Dr. Josimovic-Alasevic, Dr. Libera,

Verfahren zur Herstellung von
Bandscheibenzelltransplantaten und dessen Anwendung als
Transplantationsmaterial.

5

10

Verfahren zur Herstellung von
Bandscheibenzelltransplantaten und dessen Anwendung als
Transplantationsmaterial.

Abstract

Verfahren zur in vitro Herstellung von vitalen
Bandscheibenknorpelzelltransplantaten,

20

dadurch gekennzeichnet, dass aus einem menschlichen
(oder tierischen Organismus) vorgefallenem, degeneriertem
Bandscheibengewebe Bandscheibenknorpelzellen gewonnen
werden, diese dann in Zellkulturgefäßen so lange kultiviert
werden bis eine ausreichende Menge an Bandscheibenzellen
vorliegt, welche ihren nativen Phänotyp nicht verändert
haben sowie ein hohes Proliferations- und
Differenzierungspotential haben.

25

Beschreibung

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro
Herstellung von

35

Bandscheibenknorpelzelltransplantaten aus
vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe erkrankter
Patienten und dessen Anwendung als Transplantationsmaterial
zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben

5

und von

dreidimensionalem, vitalen, und mechanisch stabilen Bandscheibenknorpelgewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben

10

sowie deren Verwendung zur Testung von Wirkstoffen. Gegenstand der Erfindung sind auch die hergestellten Bandscheibenzelltransplantate und die hergestellten Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe und die Zelltransplantate beinhalten.

20

Die Degeneration der Bandscheiben wird während der Alterung oder durch Trauma ausgelöst und induziert akute und chronische Schmerzen und Instabilitäten in der Wirbelsäule. Mehr als 300.000 Patienten in Europa leiden an Bandscheibenerkrankungen. Die wenigen herkömmlichen Behandlungsmöglichkeiten beinhalten die Entfernung von aus dem Inneren der Bandscheibe ausgetretenen Gewebes in den Spinalkanal bei gleichzeitig intakter äußerer Hülle oder die Entfernung der gesamten Bandscheibe gefolgt vom Einsatz eines Implantates oder aber auch gefolgt von einer Fusion der beiden angrenzenden Wirbelkörper. Jedoch führen all diese Methoden zur Immobilisierung bzw. Funktionsverlust des Segmentes und teilweise auch zur Beeinflussung der benachbarten Bandscheiben.

30

Hier ist erstmals ein Verfahren beschrieben, durch welches Bandscheibenzelltransplantate hergestellt werden können, welche nach Transplantation in eine geschädigte/ degenerierte Bandscheibe durch den Aufbau neuen Bandscheibengewebes die Erhaltung der Bandscheibe und damit

35

5 die Wiederherstellung ihrer neurologischen und mechanischen Funktion nach einem Bandscheibenvorfall, dem Austreten von Bandscheibengewebe aus der Bandscheibe heraus, als Folge der Degeneration der Bandscheibe erlaubt.

10 Weiterhin wird erstmalig ein Verfahren beschrieben, welches auch bei fortgeschrittener Degeneration der Bandscheibe, d.h. auch bei Degeneration oder traumatischer Schädigung der äußeren Schicht der Bandscheibe (Annulus Fibrosus) die Wiederherstellung und Erhaltung der neurologischen, biologischen und mechanischen Funktion der Bandscheibe ermöglicht,

wobei ersteres Verfahren auf die Herstellung eines Bandscheibenzelltransplantates und letzteres auf die Herstellung eines Bandscheibengewebetransplantates beides unter Verwendung von körpereigenen Zellen isoliert aus vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe abzielt.

Eine bekannte Methode unter Verwendung von körpereigenen Zellen ist die Knorpelzelltransplantation, die zur Behandlung von Gelenksknorpeldefekten angewandt wird. Dabei wird das Potential der Gelenksknorpelzellen genutzt, um in vivo neues Gewebe aufzubauen. So werden beispielsweise dem Patienten Gelenksknorpelbiopsien entnommen, daraus Knorpelzellen isoliert, mittels Zellkultivierung vermehrt und anschließend dem Patienten die Zellen im Bereich des Gewebedefektes, z.B. durch Einspritzen, transplantiert. 30 Dort bilden sie neues Gewebe und füllen somit den Defekt vollständig auf. Durch die genannten Verfahren wird bekanntermaßen erreicht, daß nach Applikation der Zelltransplantate im Körper Gewebe aufgebaut wird.

5 Für das Tissue Engineering auf dem Gebiet der
Bandscheiberegeneration besteht das Ziel darin, nach
degenerativer Schädigung der Bandscheibe ein
Bandscheibenknorpelgewebe in der Bandscheibe mittels eines
medizinisch und ethisch vertretbaren Verfahrens aufzubauen
10 durch: Transplantation eines speziellen Zelltransplantates
oder durch Transplantation eines außerhalb des Körpers
vorgefertigten 3-dimensionalen Bandscheibenknorpelgewebe.
In der Literatur gibt es dazu bisher keine Angaben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb,
derartige Verfahren zur Herstellung von
Bandscheibenknorpelzelltransplantaten und stabilem vitalen
Bandscheibenknorpelgewebe bereitzustellen, die zur
Transplantation und zum schnellen Wiederaufbau und der
Erhaltung der Funktion der Bandscheibe geeignet sind. Dabei
20 war essentiell, daß eine Methode gefunden wird, bei der das
Ausgangsmaterial zur Herstellung der Zelltransplantate
medizinisch und ethisch vertretbar entnommen werden kann
sowie die sicherstellt, dass die kultivierten
Bandscheibenzellen ihre Eigenschaften über den Zeitraum von
der Entnahme bis zur Transplantation, die erst ca. 2 bis 3
Monate nach der Biopsatentnahme erfolgt, nicht verändern
sowie eine hohe Proliferations- und
Differenzierungskapazität aufweisen.

Ausgangsmaterial ist erfindungsgemäß das degenerierte,
30 vorgefallene Bandscheibengewebe, da aus ethischen aber auch
medizinischen Gründen für eine Behandlung in der
beschriebenen Weise keine andere Gewebequelle, wie eine
intakte benachbarte Bandscheibe, für adulte
Bandscheibenzellen zur Verfügung steht. Bisher wird
35 angenommen, dass es nicht möglich ist aus degeneriertem

5 Gewebe, adulte Zellen in ausreichender Anzahl zu isolieren,
die vital sind, ausreichend proliferieren und anschließend
auch noch in der Lage sind gewebespezifisch zu
differenzieren und Bandscheibengewebe aufzubauen, da in
10 Geweben, die einer Degeneration unterliegen
gewebespezifische Zellen absterben und auch durch andere
Zellen mit anderen gewebe-unspezifischen Eigenschaften
ersetzt werden. Überraschenderweise, konnte jedoch aus
vorgefallenem degenerierten Bandscheibengewebe eine
ausreichende Anzahl an vitalen Zellen isoliert werden, die
unter den gegebenen Kulturbedingungen dann auch noch
proliferieren und gewebespezifisch differenzieren und damit
für eine zell-basierte Therapie zur Wiederherstellung der
Funktion der Bandscheibe geeignet sind.

20 Wichtig bei der Behandlung mit den hergestellten
Bandscheibenzelltransplantaten ist, daß vor der
Transplantation die äußere Hülle der Bandscheibe, der
Annulus Fibrosus, der durch den Austritt des
Bandscheibengewebes geschädigt wurde, in der Art heilt, daß
keine Flüssigkeit, wie die hergestellten Zelltransplantate,
aus dem Inneren der Bandscheibe mehr auslaufen kann. Dieser
Zeitraum kann patienten-abhängig bis zu 3 Monate andauern.
Während dieses Zeitraumes werden die
Bandscheibenzelltransplantate hergestellt, wobei die
Bandscheibenzellen innerhalb dieser Zeit ihre gewebe-
spezifischen Eigenschaften im Hinblick auf deren
30 Differenzierungspotential und damit den Erfolg der
Transplantation nicht verändern dürfen.

Außerdem sollen die in vitro hergestellten Zell- und
Gewebetransplantate keine immunologischen Reaktionen im
35 Organismus, der das Transplantat erhält, auslösen.

5 Es wurde überraschender Weise gefunden, daß diese Aufgabe mit dem in Anspruch 1 angegebenen, einfachen Verfahren gelöst werden kann.

10 Erfindungsgemäß werden als Ausgangsmaterial patienteneigene vorgefallene, degenerierte Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden die Bandscheibenzellen aus dem degenerierten, vorgefallenen Bandscheibengewebe mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen werden dann zunächst erfindungsgemäß nur unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen und ohne den Zusatz von Antibiotika und mit üblichem Kulturmedium in Zellkulturgefäßen kultiviert und so lange 20 vermehrt, bis eine ausreichende Menge an Zellen zur Verfügung steht. Dieser Zeit wird so kurz wie möglich gehalten und die Zellen so wenig wie möglich passagiert, um ihre phänotypischen Eigenschaften nicht zu verändern. Dies wurde überraschenderweise beobachtet, wenn die Zellen lange kultiviert werden und öfters passagiert werden. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese geerntet und das Zelltransplantat bestehend aus einer Bandscheibenzellsuspension hergestellt.

30 In einem zweiten Verfahren werden die isolierten Bandscheibenzellen vorkultiviert und ohne Passagierung der Zellen nur kurzzeitig vermehrt. Danach werden die vorkultivierten Zellen geerntet und eingefroren und bis zum Zeitpunkt der Transplantation tiefgefroren gelagert. Vor der Transplantation werden die Zellen aufgetaut und bis zum 35 Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit autologem Serum

5 und in herkömmlichem Zellkulturmedium weiterkultiviert.
Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese
geerntet und das Zelltransplantat bestehend aus einer
Bandscheibenzellsuspension hergestellt. Überraschenderweise
wurde festgestellt, daß die Bandscheibenzellen durch das
10 Einfrieren und Auftauen sowie anschließendes kurzzeitiges
Vermehren nicht ihre spezifischen Eigenschaften im Hinblick
auf die Synthese von Matrixproteinen verlieren. Dies wurde
jedoch gefunden, wenn die Bandscheibenzellen über die 2-3
Monate bis zur Transplantation in Monolayer ohne Einfrieren
gehalten wurden.

In einem dritten Verfahren werden als Ausgangsmaterial
ebenfalls patienteneigene vorgefallene, degenerierte
Bandscheibengewebe verwendet. Aus den Biopsien werden die
gewebeaufbauenden Zellen mittels enzymatischem Verdau des
20 Gewebes, durch Auswandern oder durch Reagenzien, die
Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese
Zellen werden dann erfindungsgemäß mit üblichem
Kulturmedium zunächst in Monolayer kultiviert bis eine
ausreichende Zellzahl erreicht ist und anschließen in
Zellkulturgefäße mit hydrophober Oberfläche und sich
verjüngendem Boden überführt und dort so lange stationär in
Suspension kultiviert, bis ein dreidimensionales Zell-
aggregat entsteht, das zu mindestens 40 Volumen%, vorzugs-
weise mindestens 60 Volumen% bis maximal 99 Volumen%,
extrazelluläre Matrix (ECM) beinhaltet, in welche
30 differenzierte Zellen eingebettet sind. Das entstandene
Zellaggregat weist einen äußeren Bereich auf, in welchem
proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind.
Diesen Aufbau der erfindungsgemäß erhaltenen
35 Bandscheibenknorpelgewebe verdeutlicht die mikroskopische

5 Aufnahme in Abb. 1, der Querschnitt eines erfindungsgemäß
hergestellten Bandscheibengewebes mit M als Zone
verminderter Proliferation und Bildung von
gewebespezifischen Matrixproteinen und P als äußere
Proliferationszone zeigt.

10 Es ist erstaunlich, daß die aus den vorgefallenen,
degenerierten Bandscheibengeweben isolierten
Bandscheibenzellen eine hohe Proliferationskapazität
(Abb. 2) sowie ein sehr hohes Differenzierungspotential zur
Bildung bandscheibenspezifischer Matrixproteine und
Markerproteine, die sind Aggrecan (Abb. 3a), hyalin-
spezifische Proteoglykane (Abb. 3b), Kollagen Typ I (Abb.
3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d) Kollagen Typ III (Abb. 3e)
und S100 (Abb. 3f) aufweisen und ihre Eigenschaften durch
20 das Prozedere des Einfrierens und Auftauens erhalten werden
können.

Es ist erstaunlich, daß alle Zellen, die in den nach dieser
Erfindung aus Bandscheibenzellen isoliert aus
vorgefallenem, degenerierten Bandscheibengewebe und daraus
hergestellten Bandscheibenzellaggregaten in selbige
integriert sind, überleben und auch nach fortschreitender
Kultivierungsdauer die Zellen im Inneren nicht absterben.
Mit fortschreitender Kultivierungsdauer differenzieren die
30 Zellen im Inneren der Aggregate aus und es bilden sich
Bandscheibenknorpelgewebe, die aus ECM, differenzierten
Zellen und einer Proliferationszone am Rand bestehen.
Während der Differenzierung in Zellkultur wird der Abstand
der aggregierten Zellen durch Bildung der
35 gewebespezifischen Matrix immer größer. Es entsteht im

5 Inneren der in vitro hergestellten Bandscheibengewebe eine
Gewebehistologie, die dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich
ist. Die Versorgung der Zellen im Inneren der in vitro
Bandscheibengewebe erfolgt allein durch die Diffusion der
Nährstoffe. Während der weiteren Herstellung der
10 Bandscheibenknorpelgewebe bildet sich die
Proliferationszone am Rand selbiger aus. Diese Zone hat den
unschätzbaren Vorteil, daß nach Einbringen der so
entstandenen Bandscheibenknorpelgewebe in degenerierte
Bandscheiben, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in
der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum
umliegenden Gewebe herzustellen bzw. eine Integration des
in vitro gebildeten Bandscheibenknorpelgewebes in seine
Umgebung ermöglichen. Damit sind die hergestellten
gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behand-
20 lung von degenerierten Bandscheiben und zum Neuaufbau von
Bandscheibengewebe *in vivo* geeignet.

Aufgrund der biomechanischen Belastung der Bandscheiben
direkt nach Behandlung sowie dem Ziel die Bandscheibe in
ihrer Höhe gleich mit der Transplantation des
Bandscheibenknorpelgewebes wiederherzustellen, kann es von
Vorteil sein, bereits größere, mechanisch stabile
Gewebestücke zu transplantieren. Für diesen Fall werden
mindestens zwei, besser aber mehr der erhaltenen in vitro
30 Bandscheibenknorpelgewebe fusioniert, indem sie gemeinsam
unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen
Kulturgefäßen wie oben beschrieben bis zur gewünschten
Größe weiterkultiviert werden.

5 Abb. 4 zeigt fünf fusionierende Bandscheibengewebe. Es ist
zu sehen, dass die beiden Gewebekugeln aneinander haften
und sozusagen verschmelzen, die Grenze zwischen den beiden
Bandscheibengeweben ist nicht mehr zu erkennen. Nach
längerer Kultivierungszeit fusionieren die
10 Bandscheibengewebe vollständig und es entsteht ein größeres
in vitro Gewebestück. Der Aufbau der so erhaltenen größeren
Zellaggregate ist mit dem der zunächst erhaltenen in vitro
Bandscheibengewebe identisch. Sie können bis zu maximal 99%
ECM beinhalten und alle im erhaltenen Gewebestück
enthaltenen Zellen sind vital.

20 Das erhaltene Bandscheibenknorpelgewebe ist außerordentlich
stabil. Die in vitro Bandscheibengewebe können auf $\frac{1}{2}$ ihres
Durchmessers komprimiert werden, ohne daß sie zerbrechen
oder beispielsweise beim Injizieren in den Körper mittels
einer Kanüle zerrissen werden. Es ist möglich, diese
Gewebestückchen mit einer Pinzette oder einer Pipette zu
handeln.

30 Als Zellkulturmedium kann sowohl für die Suspensions- als
auch für die Monolayerkultur übliches Medium, z. B.
Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden.
Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1:1
eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des
Patienten auf das in vitro hergestellte Gewebe zu
vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autogenes Serum des
Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich xenogenes oder
allogenes Serum zu verwenden.

5 Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika,
Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich
gezeigt, daß nur die autogene oder allogene Kultivierung
der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung ohne
Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste Morphologie
10 sowie Differenzierung der Zellen in der Monolayerkultur und
eine ungestörte Bildung der spezifischen Matrix in den
Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin sind durch den
Verzicht sämtlicher Zusatzstoffe während der Herstellung
nach Einbringen des in vitro hergestellten Gewebes in den
menschlichen und auch tierischen Organismus sämtliche
immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

Die Größe der hergestellten Bandscheibengewebe hängt
natürlich von der eingebrachten Zellzahl pro Volumen
Kulturmedium ab. Werden beispielsweise 1×10^7 Zellen in
300 µl Kulturmedium eingebracht, so entstehen innerhalb von
1 Woche dreidimensionale Sphäroide von ca. 500-700 µm
Durchmesser. Die andere Möglichkeit ist die in vitro-Fusion
der kleinen Zellaggregate zu größeren - wie oben
beschrieben - und das Einbringen dieser in die Bandscheibe.
Vorzugsweise werden erfindungsgemäß zwischen 1×10^4 und
 1×10^7 Zellen in 300 µl Kulturmedium zur Herstellung der
kleinen Zellaggregate verwendet, besonders bevorzugt
 1×10^5 Zellen. Die nach einigen Tagen gebildeten in vitro
30 Bandscheibengewebe werden dann für mindestens 2-4 Wochen in
Abhängigkeit von der Zellart und den patientenspezifischen
Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium kultiviert,
um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix zu
induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne in
35 vitro Bandscheibengewebe ab ca. einer Woche Kultivierung

5 fusioniert werden, um die Größe des Gewebestückes zu erhöhen.

10 Als Zellkulturgefäße müssen für die erfindungsgemäße Kultivierung in Suspension solche mit hydrophober, also adhäsionsverhindernder Oberfläche, wie z. B. Polystyrol oder Teflon, eingesetzt werden. Zellkulturgefäße mit nichthydrophober Oberfläche können durch Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert werden. Weitere Zusätze sind nicht erforderlich. Vorzugsweise dienen als Zellkulturgefäße Napfplatten. Dabei können für die Herstellung der kleinen Zellaggregate beispielsweise 96-Napfplatten und für die Herstellung der fusionierten Aggregate 24-Napfplatten Verwendung finden.

20 Gegenstand der Erfindung sind auch therapeutische Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Bandscheibenzelltransplantate und das Bandscheibenknorpelgewebe umfassen, z.B. Injektionslösungen.

30 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Bandscheibenknorpelgewebe zur Testung von Wirkstoffen, die z. B. die Bildung und Differenzierung von Matrix und Zellen beeinflussen. Dazu werden die Bandscheibenzellaggregate erfindungsgemäß hergestellt und in unterschiedlichen Reifestadien werden die zu testenden Medikamente hinzugegeben und unterschiedlichste Parameter der in vitro Bandscheibengewebeherstellung und -reifung charakterisiert. Diese Tests sind im Vergleich zu den
35 herkömmlichen Medikamententests an Tieren oder

5 Tumorsystemen durch die Verwendung von nur autologem Material sehr patientenspezifisch und ermöglichen eine individuelle Diagnose.

10 Nachfolgend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie darauf einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten

Aus dem vorgefallenen, degenerierten Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter 20 Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden die Bandscheibenzellen in physiologische Kochsalzlösung überführt und zur Transplantation zur Verfügung gestellt.

30 In einem in vitro Modell konnte das Differenzierungspotential der im Zelltransplantat enthaltenen Bandscheibenzellen aufgezeigt werden. Es werden Bandscheibenspezifische Matrixproteine und Markerproteine exprimiert (Abb. 3) und damit eine Bandscheiben-spezifische Gewebestruktur aufgebaut.

Beispiel 2: Transplantation von Bandscheibenknorpelzellen

Die in Beispiel 1 hergestellten Bandscheibenzelltransplantate (mind. 1.000, max. 100 Millionen Zellen) vorzugsweise ca. 1 Million Bandscheibenknorpelzellen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in den Zwischenwirbelraum einer degenerierten Bandscheibe eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass in der behandelten Bandscheibe der Wassergehalt wieder ansteigt, sowie die Höhe des Zwischenwirbelraumes aufrechterhalten werden kann, was beides auf die durch die Bandscheibenknorpelzellen synthetisierten Matrixproteine zurückzuführen ist.

Die erfindungsgemäße in vitro hergestellte Bandscheibenzelltransplantate werden von den Patienten angenommen, gewährleisten eine rasche Integration der proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen sowie eine Regeneration des Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit der enthaltenen Zellen. Somit erlauben Eigenschaften der Bandscheibenzelltransplantate den schnellen Wiederaufbau von Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

Beispiel 3: in vitro Herstellung von Bandscheibenknorpelgewebe

Aus dem vorgefallene Bandscheibengewebe werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Bandscheibenknorpelzellen isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Gewebe, werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO₂

5 inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden 1×10^5 Zellen in je
10 ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert. Die Zellen können hier auch passagiert werden.

In diesen *in vitro* Bandscheibengewebe wurde die Expression und Deposition von bandscheiben-spezifischen Matrixbestandteile und Markerproteinen wie Aggrecan (Abb. 3a), hyalin-spezifische Proteoglykane (Abb. 3b), Kollagen Typ I (Abb. 3c), Kollagen Typ II (Abb. 3d), Kollagen Typ
20 III (Abb. 3e) und S100 (Abb. 3f) nachgewiesen. Diese Bestandteile des nativen Bandscheibenknorpelgewebes *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für die Funktion des Knorpels von entscheidender Bedeutung sind.

Beispiel 4: Transplantation von Bandscheibenknorpelgewebe

Das in Beispiel 3 hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe (ca. 10 bis 1000 Gewebestückchen aus je 1×10^5 Zellen)
30 vorzugsweise 100 Gewebestückchen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in den Zwischenwirbelraum von stark degenerierten oder auch stark traumatisch geschädigten Bandscheiben mit zerstörtem Annulus Fibrosus eingespritzt. Es wurde unter anderem festgestellt, dass die
35 erfindungsgemäß *in vitro* hergestellte

5 Bandscheibenknorpelgewebe von den Patienten angenommen
werden und gewährleistet neben der Erfüllung der
mechanischen Funktion des hergestellten Gewebes die rasche
Integration der hergestellten Gewebestücke durch die
10 proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen in der
äußeren Schicht der Aggregate sowie eine Regeneration des
Bandscheibengewebes durch die Differenzierungsfähigkeit der
enthaltenen Zellen. Somit erlaubt die Struktur und Funktion
der Gewebestücke den schnellen Wiederaufbau von
Bandscheibengewebe, eine schnelle Genesung der Patienten
und die Wiederherstellung der Bandscheibenfunktion.

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten, dadurch gekennzeichnet, daß aus vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe Bandscheibenknorpelzellen isoliert und unter Erhalt ihrer Eigenschaften vermehrt werden können sowie differenzierungsfähig sind und damit in der Lage sind Bandscheibengewebe nach Transplantation und in vitro aufzubauen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bandscheibenknorpelzellen aus vorgefallenem und degeneriertem Bandscheibengewebe isoliert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Bandscheibenknorpelzellen unter streng autologen Kulturbedingungen, d.h. nur unter Zusatz von patienten-eigenem Serum im Zellkulturmedium vermehrt werden
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Bandscheibenknorpelzellen derart vermehrt werden, daß ihre Eigenschaften im Hinblick auf die Synthese von spezifischen Matrixproteinen und Markerproteinen nicht verändert wird.

- 5 5. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die isolierten Bandscheibenknorpelzellen nach kurzer
Vorkultivierung eingefroren werden und wieder aufgetaut
werden können, ohne dass ihre Eigenschaften im Hinblick
10 auf die Synthese von spezifischen Matrixproteinen und
Markerproteinen verändert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung
in Monolayer, die Eigenschaft zum Aufbau einer
Matrixstruktur bestehend aus spezifischen
Bandscheibenmatrixproteinen aufweisen.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die isolierten Bandscheibenzellen nach deren Vermehrung
in Monolayer und dem Einfrieren und folgendem Auftauen,
die Eigenschaft zum Aufbau einer Matrixstruktur
bestehend aus spezifischen Bandscheibenmatrixproteinen
aufweisen.
- 30 8. Verwendung von Bandscheibenzelltransplantaten gemäß
Anspruch 1 als autogenes, xenogenes oder allogenes
Transplantationsmaterial zur Behandlung von
degenerierten Bandscheiben

- 5 9. Therapeutische Zubereitung umfassend
Bandscheibenzelltransplantate gemäß Anspruch 1.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß die
Bandscheibenknorpelzellen und in vitro
Bandscheibenknorpelgewebe auch in Anwesenheit von
wachstumsfördernden Zusätzen kultiviert werden können.

5

Zusammenfassung

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Herstellung von Bandscheibenzelltransplantaten hergestellt aus Bandscheibenzellen isoliert aus vorgefallenem, degeneriertem Bandscheibengewebe, die unter Erhalt ihrer spezifischen Eigenschaften vermehrt werden, eine hohe Proliferationskapazität aufweisen, differenzierungsfähig im Hinblick auf die Ausbildung einer Bandscheiben-spezifischen Matrix sind und transplantiert werden.

20

Gegenstand der Erfindung sind auch das hergestellte Bandscheibenknorpelgewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe beinhalten.

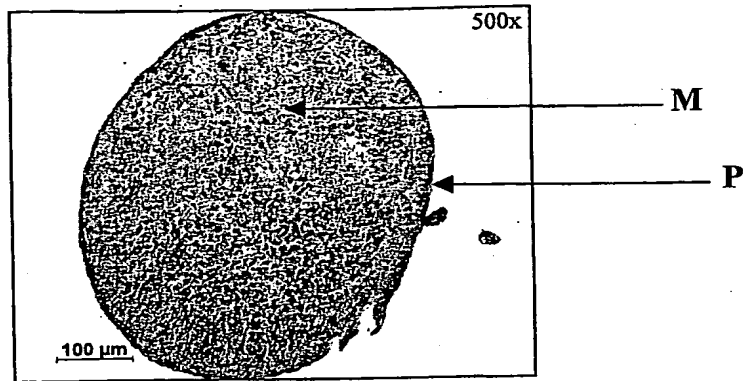


Abb.1

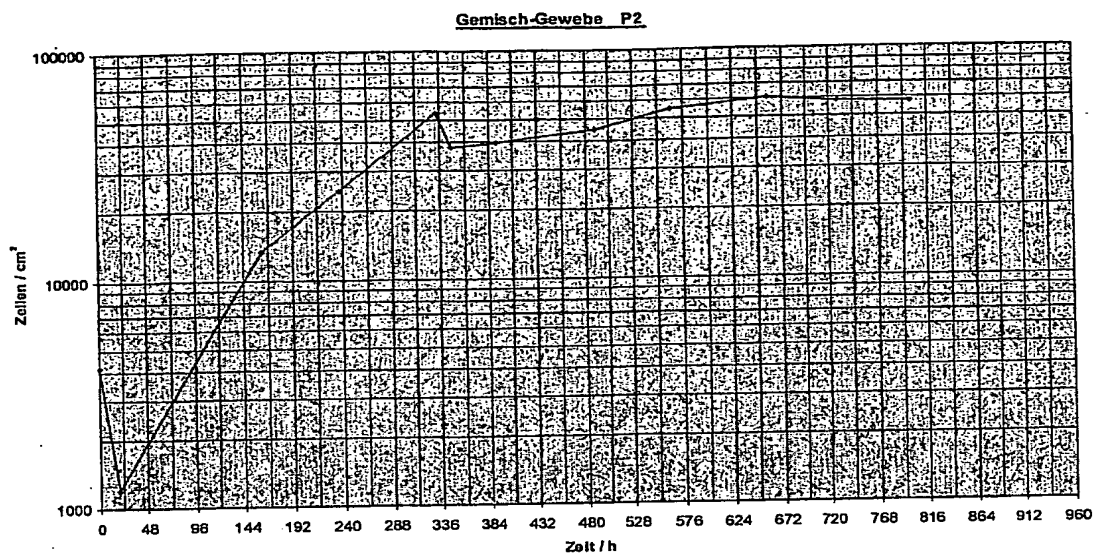


Abb.2

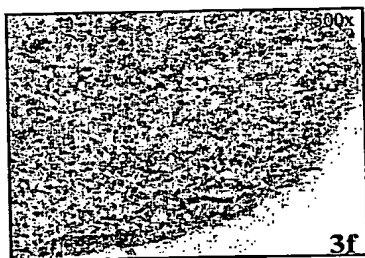
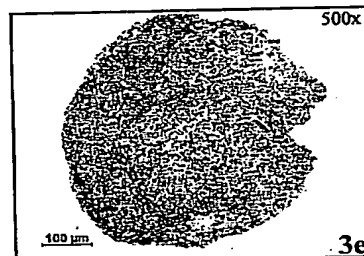
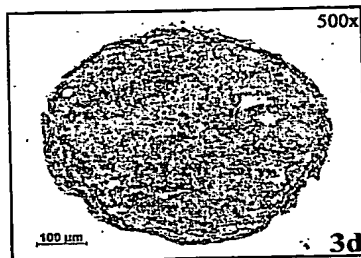
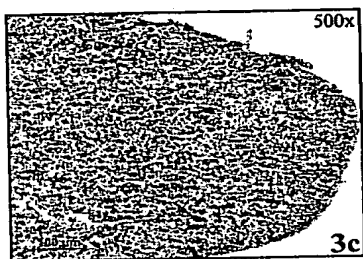
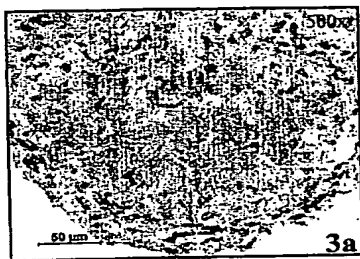


Abb.3

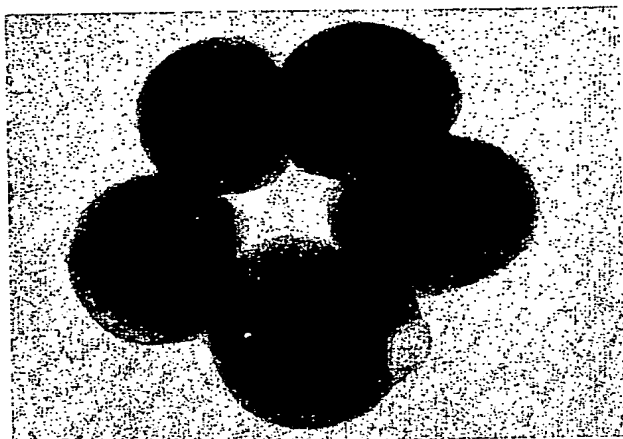


Abb.4